QUALITATIVE UND QUANTITATIVE BESTIMMUNG TRICYCLISCHER ANTIDEPRESSIVA AUS DEM SERUM DURCH HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE

Dipl. Chem. Ivar Hess

1979

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 268177

Aus der Psychiatrischen Klinik der
Universität München
Direktor: Prof.Dr.H.Hippius

QUALITATIVE UND QUANTITATIVE BESTIMMUNG TRICYCLISCHER ANTIDEPRESSIVA AUS DEM SERUM DURCH HOCH-DRUCKFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dipl.Chem. Ivar Hess

aus

München

München 1979

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter :	Prof. Dr. N. Matussek
Mitberichterstatter :	Prof. Dr. H. Hippius
Dekan :	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung :	22. März 1979

UNIV. LEIDEN BIBL.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente und Untersuchungen wurden auf Anregung und unter Anleitung von Prof. Dr. N.Matussek in der Abteilung für Neurochemie der Psychiatrischen Klinik der Universität München in der Zeit von Juni 1976 bis April 1977 durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. N.Matussek danke ich für die Überlassung des Themas und die zahlreichen Anregungen, sowie für die freundliche Betreuung bei der Planung und Durchführung der Arbeit.
Herrn Dr.H.J.Kuss danke ich für die kollegiale Unterstützung.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
Einleitung	1
Problemstellung und Zielsetzung	5
Material und Methoden	7
Ergebnisse	10
Diskussion	18
Zusammenfassung	24
Literaturverzeichnis	26
Lebenslauf	31

EINLEITUNG

Psychoaktive Substanzen sind aus der Therapie psychiatrischer Erkrankungen heute nicht mehr wegzudenken. Trotz der breiten Anwendung gibt es aber nur bei einigen dieser Pharmaka fundierte Untersuchungen über die Pharmakokinetik, den Metabolismus und die Frage inwieweit eine Abhängigkeit zwischen im peripheren Blutstrom messbaren Plasmaspiegeln und klinischer Auswirkung besteht und wie diese für die einzelnen Pharmaka aussieht.

In aller Regel werden diese Pharmaka nicht als Einzeldosis verabreicht, sondern über einen längeren Zeitraum. Dabei stellt sich bei gleichbleibender Dosierung eine Gleichgewichtskonzentration ein, die als Index für die im Körper vorhandene Gesamtmenge gelten kann. Diese Gleichgewichtskonzentration ist von verschiedenen Parametern abhängig. Diese sind: Größe der Einzeldosis, Resorptionsquote nach oraler Aufnahme, zeitlicher Abstand der Einzeldosen, Verteilungsvolumen, zur Ausscheidung führender Metabolismus oder Ausscheidung in nicht metabolisierter Form. Der Metabolismus einer Substanz ergibt sich aus der Wechselwirkung von Faktoren, die genetisch determiniert sind und die durch äußere Einflüsse verändert

werden können. Ist der Metabolismus herabgesetzt, führt dies zu einer erhöhten Gleichgewichtskonzentration im Serum und umgekehrt.

Äußere Ursachen, die den Metabolismus einer Substanz beeinflussen können sind das Alter, das Rauchen und der Gebrauch von Medikamenten. So nimmt mit zunehmendem Alter die Geschwindigkeit der Metabolisierung einer Substanz ab, weil das Verhältnis stoffwechselaktiver Leberzellmasse zur Gesamtkörpermasse abnimmt. Bei älteren Patienten ist deshalb bei gleicher Dosis, bezogen auf das Körpergewicht, mit einer höheren Gleichgewichtskonzentration im Serum zu rechnen. Im Gegensatz dazu führt das Rauchen über die Induktion microsomaler Enzyme in der Leber zu einer erhöhten Stoffwechselaktivität, die bei gleicher auf das Körpergewicht bezogener Dosis zu einer niedrigeren Gleichgewichtskonzentration im Serum des Patienten führt. In dieser Beziehung dem Rauchen gleichzusetzen ist der regelmäßige Gebrauch von Medikamenten, die hauptsächlich in der Leber abgebaut werden.

Insgesamt ergibt sich aus dem oben Gesagten die Erklärung für die Tatsache wie es bei gleicher oraler Dosis zu interindividuellen Schwankungen der Blutplasmaspiegel bis zum zwölffachen kommen kann.

Bereits vor 11 Jahren wurde gezeigt (11), daß nach

Einnahme der gleichen oralen Dosis von tricyclischen Antidepressiva die Blutplasmaspiegel sich erheblich von einem Individuum zum anderen unterschieden. Diese Tatsache wurde auch durch zahlreiche andere Arbeiten überprüft (1, 9, 13, 18).Eine andere Arbeit (8) machte klar, daß die Ursache für die Schwankungen in den microsomalen Enzymen der Leber lag.

Seit dem Zeitpunkt, an dem diese Unterschiede dokumentiert wurden,ist aber die eigentliche Frage, in welchem Ausmaß diese unterschiedlichen Gleichgewichtskonzentrationen im Blut die Klinik beeinflußen und wie die entsprechenden Dosis-Wirkungskurven aussehen.

Die Arbeit von Perel et al.(14) gibt einen Überblick über die in den letzten Jahren in diesem Zusammenhang angestellten Untersuchungen und kommt zu dem Ergebnis, daß bis jetzt diese Untersuchungen aufgrund zu weniger Daten über die Plasmakonzentrationen noch nicht ausreichen, um eine zuverlässige Aussage machen zu können. Grund dafür ist die Tatsache, daß für die Bestimmung der Plasmaspiegel keine geeigneten Methoden zur Verfügung stehen, die einfach und genau genug sind, als daß damit eine Vielzahl von Daten erfaßt werden könnten. Weiter

werden diese Untersuchungen durch die Tatsache kompliziert, daß nicht nur die Ausgangssubstanzen aktiv sind, sondern auch in einer Vielzahl von Fällen, so zum Beispiel bei Amitriptylin und Imipramin (10) deren Metabcliten, also Nortriptylin und Desimipramin. Dabei können die Metaboliten aber andere psychotrope Wirkungen haben als die Muttersubstanzen, so daß sich die erreichte therapeutische Wirkung aus mehreren Faktoren zusammensetzt. In solchen Fällen wäre es vorteilhaft, wenn man mit der gleichen Methode die Muttersubstanz und die aktiven Metaboliten quantitativ und qualitativ erfassen könnte.

Alles in allem ist das Problem aller sich mit dem Zusammenhang zwischen Plasmaspiegel und klinischer Wirkung befassenden Untersuchungen die Tatsache, daß aufgrund komplizierter Analysenmethoden nur kleine Zahlen von Versuchstieren, Probanden und Patienten untersucht werden konnten.

Voraussetzung für die Untersuchung der Interaktion von Plasmaspiegel und klinischer Wirkung ist die Entwicklung einer Analysenmethode, die es erlaubt auf einfache Weise genaue Werte zu erhalten, um dann aus einer Vielzahl von Werten eine signifikante Aussage machen zu können.

PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Tatsache, daß es in unserem Labor bereits eine gaschromatographische Methode zur quantitativen Bestimmung des sekundären Amins Nortriptylin (2, 4) gab, daß aber Amitriptylin analog nicht bestimmbar war, da Amitriptylin als tertiäres Amin nicht mit Trifluoressigsäureanhydrid reagiert. Diese Umsetzung ist notwendig, um durch Verwendung eines Elektroneneinfangdetektors am Ausgang des Gaschromatographen eine ausreichende Empfindlichkeit zu erreichen (4). Ein Versuch der selektiven Demethylierung am tertiären Stickstoffatom und die anschließende Fluorierung wurde nach Literaturstudium als aussichtslos aufgegeben, weil mit keiner Methode die notwendige Selektivität und Ausbeute zu erreichen ist. Die qualitative und quantitative Bestimmung tricyclischer Antidepressiva ist schon seit geraumer Zeit durch Anwendung dünnschichtchromatographischer (6) und, wie oben beschrieben, gaschromatographischer Methoden möglich (2, 4). Hinzu kommen seit neuester Zeit die Kopplung von Gas- und Massenspetroskopie (3) und erste Versuche mit der Hoch - druckflüssigkeitschromatographie (12, 15).

Unser Ziel war die Entwicklung einer rationell arbeitenden und quantitativ möglichst genauen Analysenmethode, die folgende Kriterien erfüllen sollte:

- leichte Aufbereitung des Untersuchungsmaterials
- gute Abtrennung begleitender Verunreinigungen und Metaboliten
- ausreichende Empfindlichkeit
- gute Reproduzierbarkeit

Da die Dünnschichtchromatographie eine zeitlich aufwendige und im Verhältnis unempfindliche Methode ist, die Gaschromatographie mit Elektroneneinfangdetektor, abgesehen von ihrer Störanfälligkeit, die Bestimmung tertiärer Amine (z.B. Amitriptylin und Imipramin) nicht zuläßt und die Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektroskopie als sehr aufwendige Methode nicht für den Routinebetrieb in einer Klinik geeignet ist, wendeten wir unser Interesse der verhältnismäßig neuen Methode der Hochdruckflüssigkeitschromatographie zu.

MATERIAL UND METHODEN

Chemikalien:

Für die Herstellung der Extraktionslösungen sowie des Eluens wurden analysenreine Chemikalien der Fa.Merck verwendet, die nicht weiter gereinigt wurden.

Untersucht wurden folgende Verbindungen:

Haloperidol, Sulpirid, Imipramin, Desmethylimipramin, Protriptylin, Amitriptylin, Nortriptylin und Clozapin.

Geräte:

Für die Extraktion wurden sorgfältig gereinigte gläserne Reagenzgläser verwendet, die mit einem Schliffstopfen zu verschließen waren. Das Ein - engen der extrahierten Lösungen erfolgte im Stickstoffstrom. Die hochdruckflüssigkeitschromatographische Trennung erfolgte mit dem Gerät S 100 der Firma Siemens. Als Detektor wurde das variable UV-Photometer P M 4 mit eingebautem Transmissions-Extinktionswandler der Firma Zeiss verwendet. Die Trennsäulen waren aus V 4 A- Stahl gefertigt und bei einem inneren Durchmesser von 3 mm 25 cm lang. Das Photometer-Signal wurde durch den Schreiber Kompensograph III der Firma Siemens aufgezeichnet.

Extraktion der Pharmaka aus dem Plasma :
Wir nahmen in Anlehnung an die Arbeit von BORGÅ und GARLE (4) die Extraktion wie folgt vor. Zu 4,0 ml Serum wurden zugesetzt: 2,0 ml einer 2 n $NaHCO_3$-Puffers mit dem pH = 10,7 , 1 µg Protriptylin in 0,10 ml wässriger Lösung, 6,0 ml n-Hexan. Das erhaltene Gemisch wurde 10 Minuten geschüttelt und anschließend zur Phasentrennung 10 Minuten bei 2.550 U/Min zentrifugiert. Die Hexanphase wurde mit einer Pasteurpipette abgetrennt, mit 1,0 ml einer 0,1 n H_2SO_4-Lösung versetzt und wie oben beschrieben geschüttelt und zentrifugiert. Dann wurde die Hexan-Phase abgetrennt und verworfen. Zur wässrigen Lösung wurden 0,1 ml 5 n NaOH-Lösung und 2 ml n-Hexan zugegeben, wieder geschüttelt und zentrifugiert. Jetzt wurde die wässrige Phase verworfen, die Hexanphase abgetrennt und bis zur Trockne im Stickstoffstrom eingedampft. Der im Reagenzglas verbliebene Rückstand wurde in 0,1 ml bzw. bei kleinen Konzentrationen in 0,05 ml Eluens aufgenommen.

Quantitative Bestimmung durch HPLC :
Die V 4 A - Stahlsäulen waren mit LiChroSorb SI 100 der Fa.Merck, Teilchengröße 5 µ gefüllt. Es wurden sowohl selbst gefüllte als auch fertig ge-

füllte Säulen verwendet. Die Bodenzahl betrug im Mittel 10.000 bis 14.000 Böden pro Meter. Das Eluens hatte die Zusammensetzung: 97 % Methanol mit 3 % Ammoniak. Die Flußrate betrug 1 ml/Minute; der sich dabei einstellende Druck lag zwischen 100 und 120 Bar. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 240 nm. Bei 0,04 EE erreichte der Schreiber den Vollausschlag, der Papiervorschub war 1 cm/Min.

Für die Trennung wurden jeweils 0,01 ml der in Eluens aufgenommenen Proben auf die Trennsäule aufgebracht. Die quantitative Auswertung der einzelnen Substanzen erfolgte durch den Vergleich der Maxima-Flächen (aus Höhe mal Breite auf halber Höhe) mit für jeden Analysengang neu erstellten Standardflächenkurven für den Bereich von 0 bis 100 ng. Als interner Standard für die Amitriptylin- bzw. Nortriptylinbestimmung wurde Protriptylin verwendet.

ERGEBNISSE

Untersucht wurde das chromatographische Verhalten der in Tabelle 1 aufgeführten Psychopharmaka unter den in Material und Methoden beschriebenen Bedingungen. Die Reinsubstanzen wurden direkt in Eluens gelöst und einzeln sowie in unterschiedlichen Mischungen chromatographiert. Abbildung 1 zeigt eine Mischung aller in Tabelle 1 genannten Verbindungen. Bei nahezu allen Substanzen findet eine Trennung bis zur Basislinie statt.

TABELLE 1 : Liste der untersuchten Pharmaka

PROBE	RETENTIONSVOLUMEN (ml)
Haloperidol	4,4
Clozapin	4,9
Amitriptylin	5,3
Imipramin	5,9
Sulpirid	6,6
Nortriptylin	8,2
Desimipramin	10,3
Protriptylin	12,8

Aufgeführt sind die untersuchten Pharmaka in der Reihenfolge zunehmender Retentionsvolumina. Die chromatographischen Bedingungen waren wie unter Abbildung 1 angegeben.

P - Protriptylin
D - Desimipramin
N - Nortriptylin
S - Sulpirid
I - Imipramin
A - Amitriptylin
C - Clozapin
H - Haloperidol

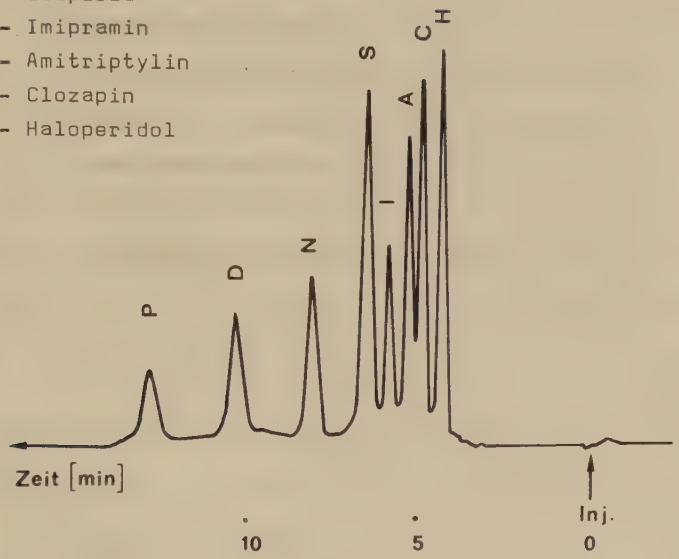

ABBILDUNG 1

Chromatogramm einer Lösung, die pro 1 ml enthielt: je 10 µg Haloperidol, Sulpirid, Imipramin, Desmethylimipramin, Protriptylin sowie je 5µg Amitriptylin, Nortriptylin und Clozapin. 0,01 ml dieser Lösung in Eluens wurden chromatographiert. Die Bedingungen waren: HPLC-Chromatograph Siemens Modell s 100, V 4 A-Edelstahlsäulen, innerer Durchmesser 3 mm, Länge 250 mm, LiChroSorb SI 100 (Fa.Merck), Teilchengröße 5µ, Bodenzahl 14.000/m, Eluens: 97% Methanol + 3% Ammoniak, Flußgeschwindigkeit 1 ml/min, 120 Bar, Absorptionsmessung bei 240 nm, Transmissions-Extinktionswandler, Schreibervollausschlag bei 0,04 EE, Schreibergeschwindigkeit 1 cm/min.

An Amitriptylin, Nortriptylin und Protriptylin überprüften wir die Möglichkeit einer quantitativen Be-

stimmung durch die Hochdruckflüssigkeitschromatographie. Für die drei genannten Verbindungen erstellten wir Standardkurven für den Bereich von 0 bis 100 ng. Dazu wurden von jedem Pharmakon Proben der Reinsubstanzen von je 5 ng, 10 ng, 25 ng, 50 ng, 75 ng und 100 ng chromatographiert. Abbildung 2 zeigt, daß der Verlauf der Standardkurven in diesem Bereich linear ist. Die unterste, sicher für die quantitative Auswertung verwertbare Nachweisgrenze lag bei 5 ng.

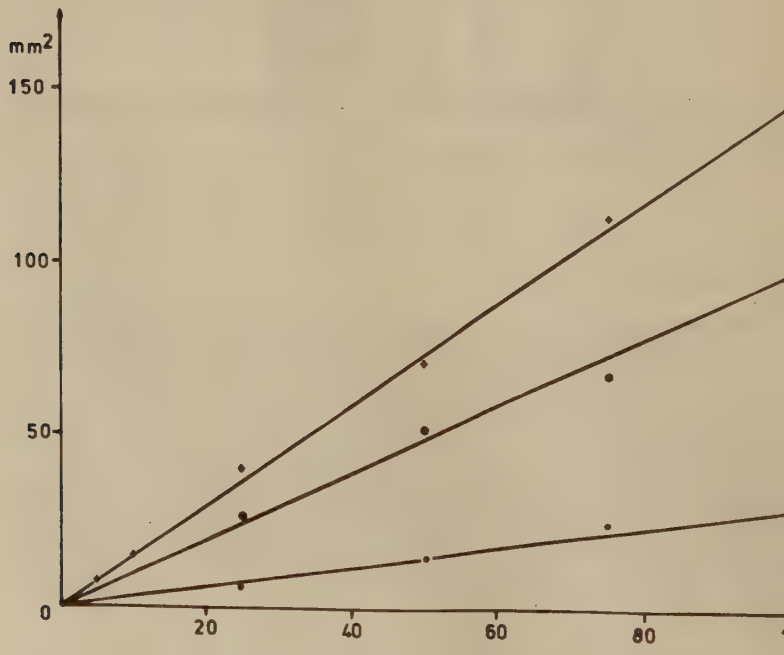

ABBILDUNG 2
Standardkurven von Amitriptylin (A), Nortriptylin (N), Protriptylin (P) im Bereich 0 bis 100 ng. Sonst wie Abb. 1.

Die verwendete Extraktionsmethode hatte den Vorteil die gewünschten Substanzen in guter Ausbeute (50 bis 85 %) und in großer Reinheit aus dem Serum zu extrahieren. In Tabelle 2 ist die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Bestimmungsmethode zusammengestellt. Von 24 ml Mischserum wurden 4 ml für den Serumleerwert abgezweigt. Den restlichen 20 ml wurden in 0,05 ml je 0,5 µg Amitriptylin und Protriptylin zugesetzt. Die Mischung wurde in fünf Proben zu je 4 ml geteilt und dem Analysengang unterworfen. Durch Ausmessen der Maxima (Höhe mal Breite auf halber Höhe) und anhand einer vorher erstellten Standardkurve (Abbildung 2) für Amitriptylin und Protriptylin konnten die Extraktionsausbeuten bestimmt werden. Zur Überprüfung des Extraktionsverhaltens der beiden untersuchten Verbindungen wurde der Flächenquotient Amitriptylin zu Protriptylin gebildet. Dieser Quotient blieb in allen Proben konstant, was auf ein analoges Extraktionsverhalten schließen läßt.

TABELLE 2 : Reproduzierbarkeit der Bestimmung

Nr.	ng	%-Abweichung	Extr.Ausb.	Flächenquot.
1	100,2	+ 0,2	86 %	1,71
2	114,0	+ 14,0	61 %	1,76
3	100,8	+ 0,8	50 %	1,69
4	116,0	+ 16,0	67 %	1,80
5	96,6	- 3,4	85 %	1,78

Störende Verunreinigungen wurden weitgehend zurückgehalten. Abbildung 3 zeigt das Chromatogramm von Mischserum ohne Zusatz von Protriptylin.

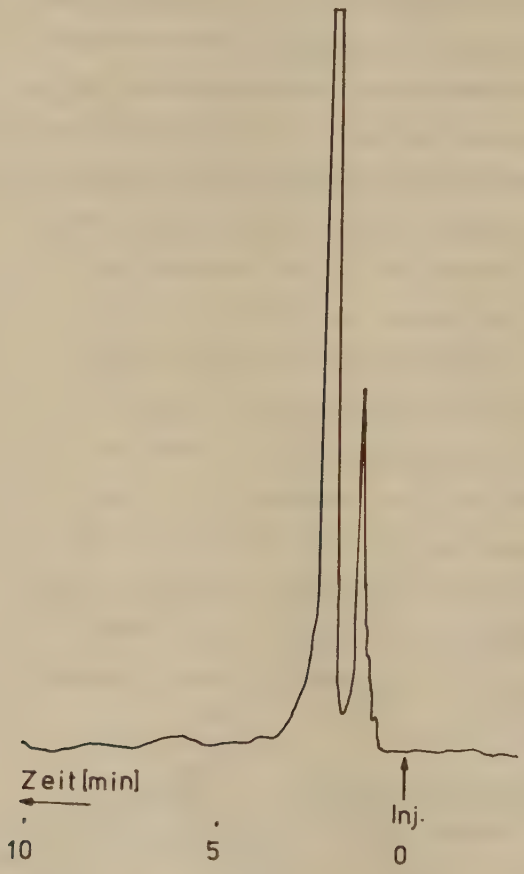

ABBILDUNG 3

Chromatogramm eines Serumleerwertes. 4 ml Mischserum wurden wie beschrieben extrahiert und 0,01 ml der erhaltenen 0,1 ml chromatographiert. Bedingungen wie bei Abbildung 1.

Zur Erprobung der Bestimmungsmethode wurde bei einer Reihe von nur mit Amitriptylin behandelten Patienten Blutproben abgenommen und auf ihren Gehalt an Amitriptylin untersucht (Abbildung 4).

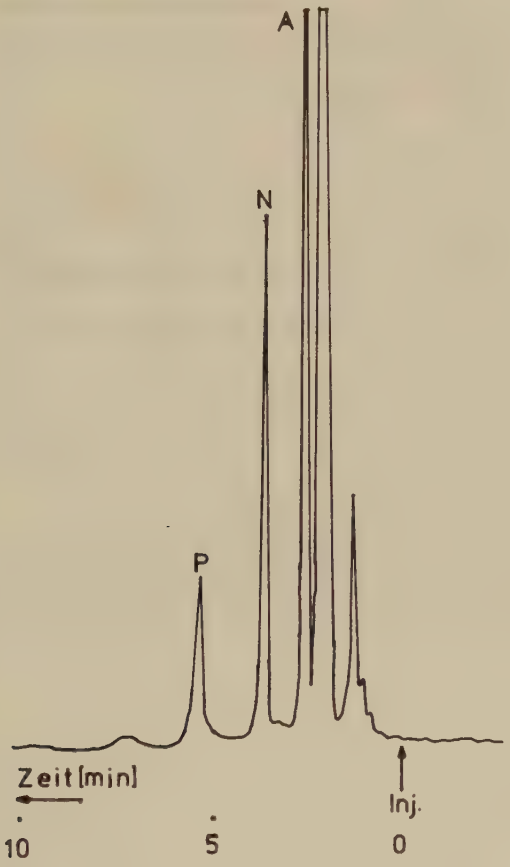

ABBILDUNG 4
Chromatogramm von 4 ml Serum eines mit Amitriptylin(A) behandelten Patienten. Innerer Standard ist Protriptylin (P). Ein großer Teil des resorbierten Amitriptylins wurde zu Nortriptylin (N) metabolisiert. Sonst wie Abb.1

Die Abnahme der Blutproben erfolgte bei den durchweg stationär behandelten Patienten morgens, nüchtern und vor Einnahme des Medikaments. Allerdings war die Dauer der Behandlung nicht bei allen Patienten gleich. Bei einigen Patienten erfolgte die Blutabnahme wenige Tage, bei anderen einige Wochen nach Beginn der Behandlung.

Die Analyse von fünfzehn Proben zeigt, daß bei gleicher Tagesdosis die Plasmaspiegel in einem weiten Bereich schwanken und der durch Demethylierung entstehende Metabolit Nortriptylin zum Teil gar nicht oder zum überwiegender Teil gebildet wird. Als Ausdruck der individuellen Demethylierungsrate kann der Quotient Nortriptylin zu Amitriptylin gebildet werden. In Tabelle 3 sind die gemessenen Serumwerte und die Demethylierungsrate nach steigender oraler Tagesdosis zusammengestellt.

TABELLE 3 : Serumwerte von Amitriptylin und Nortriptylin bei mit Amitriptylin behandelten Patienten

Nr.	DOSIS mg/die	AMITRIPTYLIN ng/ml	NORTRIPTYLIN ng/ml	DMR*
1	25	40	0	∞
2	75	28	55	1,96
3	75	44	25	0,57
4	75	54	45	0,84
5	75	69	0	∞
6	75	160	200	1,25
7	125	67	63	0,94
8	150	25	31	1,24
9	150	44	37	0,84
10	150	53	69	1,11
11	150	57	101	1,77
12	150	82	0	∞
13	150	154	0	∞
14	175	88	106	1,20
15	225	159	173	1,09

* DMR = Demethylierungsrate, d.h. $\frac{\text{Nortriptylin}}{\text{Amitriptylin}}$

Zusammengestellt sind die mittels HPLC bestimmten Serumwerte für Amitriptylin und Nortriptylin sowie die individuellen Demethylierungsraten von 15 Patienten, die stationär mit den angegebenen Dosen Amitriptylin oral behandelt wurden.

DISKUSSION

Die qualitative und quantitative Bestimmung tricyclischer Antidepressiva aus dem Serum ist aus verschiedenen Gründen von großem Interesse. Stellvertretend seien hier pharmakokinetische und toxikologische Untersuchungen sowie möglicherweise die Einstellung eines therapeutischen Blutspiegels bei psychiatrischen Patienten genannt.
Bereits seit längerem werden die Dünnschichtchromatographie und die Gaschromatographie als Bestimmungsmethoden verwendet (2, 4, 6). Die Dünnschichtchromatographie ist eine zeitlich sehr aufwendige und dabei im Verhältnis unempfindliche Methode. Die Gaschromatographie erlaubt, wie bereits ausgeführt, bei der Verwendung von Elektroneneinfangdetektoren die Bestimmung tertiärer Amine, z.B. Amitriptylin und Imipramin nicht, da bei diesen die zum Nachweis erforderliche Reaktion mit fluorierten Säureanhydriden nicht möglich ist. Die Gaschromatographie mit nachgeschaltetem Massenspektrometer (3) ist eine elegante, genaue und universell anwendbare Methode. Der hohe Gestehungspreis, die komplizierte Bedienung und die Störanfälligkeit verhindern leider die Anwendung dieser sehr empfindlichen Nach-

weismethode im täglichen Routinebetrieb.
Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (7) ist ebenso wie die anderen modernen analytischen Methoden in hohem Maße von der Qualität des verwendeten Gerätes abhängig. Auf die untere Nachweis - grenze haben in besonderem Maße Einfluß: die Konstanz des Durchflusses, das System zur Einbringung der Proben und der UV - Detektor. Dieser sollte je nach Einsatzbereich und Problemstellung mit konstanten oder variablen Wellenlängen arbeiten.
Anlaß zu Störungen und Fehlerquellen bei der HPLC sind im wesentlichen inkonstante Durchflußraten und Undichtigkeiten am System. Inkonstante Durchfluß - raten entstehen durch schlechte Pumpen und inhomogene Säulenfüllungen. Undichtigkeiten führen zum Auftreten von Gasblasen im System, die ihrerseits zu inkonstanten Durchflußraten und im Detektor zu starken Störungen führen.
Zum problematischsten Teil eines Hochdruckflüssigkeitschromatographen gehört das System zum Einschleusen der Proben in das unter Drucken bis zu 500 Bar und mehr stehende System. Gerade hier müssen hohe Anforderungen an die Dichtigkeit der sich gegen - einander bewegenden Teile gestellt werden.
Eine weitere wichtige Voraussetzung für die Genau-

igkeit und Reproduzierbarkeit der Analysenergebnisse ist die Güte der Extraktion der zu bestimmenden Verbindungen aus der biologischen Flüssigkeit. Eine gute Trennung ist nur dann möglich, wenn interferierende Substanzen im Trennungs- und Reinigungsgang entfernt worden sind. Die Extraktion ist die Vortrennung, die die Ergebnisse entscheidend beeinflußt.

Nach Versuchen mit verschiedenen Extraktionsmethoden, Eluentien und Trägermaterialien erwies sich das in Material und Methoden beschriebene Verfahren als das Beste. Die Extraktion aus dem Serum erfolgte nach dem Prinzip der doppelten Rückextraktion (4). Dabei werden die Amine im alkalischen Bereich in die Hexanphase überführt, in eine saure wässrige Phase zurückgeschüttelt und nach Alkalisieren der wässrigen Lösung erneut in eine Hexanphase gebracht. Die Ausbeuten liegen zwischen 50 % und 85 % (Tab.2) . Dieser verhältnismäßig große Verlust und die Variabilität der Ausbeuten sind jedoch durch den zugegebenen internen Standard Protriptylin ohne weiteres rechnerisch ausgleichbar. Erst diese etwas aufwendige Vortrennung erlaubt es die flüssigkeitschromatographische Analyse vorzunehmen. Trotzdem

erhält man bei Extraktionen aus dem Serum immer ein Vormaximum, das aus einer bis jetzt noch nicht identifizierten Substanz bzw. einem Substanzgemisch besteht (Abb. 4).
Die analysierten Blutproben von nur mit Amitriptylin behandelten Patienten (Tab. 3) bewiesen die Tauglichkeit der hier beschriebenen Methode. Die gemessenen Plasmakonzentrationen lagen in dem auch von anderen Autoren angegebenen Bereich(5,16,17,19,20). Ebenso bestätigte sich, daß Amitriptylin in wechselndem Ausmaß zu Nortriptylin metabolisiert wurde. Der niedrigste Amitriptylin-Wert war 25 ng/ml Plasma, der höchste 160 ng/ml Plasma. Für Nortriptylin waren die entsprechenden Werte 0 ng/ml und 200 ng/ml Plasma.

Über den Metabolismus der tricyclischen Pharmaka ist heute bekannt, daß der Umbau über drei Hauptabbauwege erfolgt (10):

Demethylierung am Stickstoff (schnell)
Oxidation am Stickstoff
Hydroxylierung am aromatischen Kern (langsam)

Die Plasmahalbwertszeiten der gebildeten Metaboliten unterscheiden sich voneinander. So hat Amitriptylin eine Halbwertszeit von 20 bis 30 Stunden und der durch Demethylierung entstehende Metabolit Nortriptylin eine Halbwertszeit von 35 bis 45 Stunden (14). Daraus

ergibt sich, daß es zur Kumulation der Verbindung mit der längeren Plasmahalbwertszeit kommt. Dies kann eine mögliche Erklärung für die auch von uns festgestellten zum Teil höher liegenden Werte von Nortriptylin sein. Da Nortriptylin selbst therapeutisch verwendet wird ergibt sich für Amitriptylin, daß sich dessen Wirkung aus dem Zusammenwirken beider Substanzen ergibt.

Unsere Versuche waren zunächst darauf ausgerichtet das tertiäre Amin Amitriptylin zu bestimmen, weil dieses der gaschromatographischen Bestimmung nicht zugänglich war. Wir stellten aber fest, daß zusätzlich zu Amitriptylin, Nortriptylin und Protriptylin eine ganze Reihe weiterer Psychopharmaka mit dieser Methode ohne Änderung der Versuchsbedingungen in einfacher und schneller Weise bestimmt werden können (Tab. 1). Dies eröffnet der HPLC einen weiten Einsatzbereich in der pharmakologisch - klinischen Forschung der tricyclischen Antidepressiva und anderer Psychopharmaka. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Tatsache, daß die analysierten Substanzen unzerstört und gereinigt am Auslauf aufgefangen werden können. Dadurch können weitere physikalisch-chemische Untersuchungen, z.B. Massenspektroskopie, angestellt

werden, was Analyse, Identifizierung und Struktur - aufklärung unbekannter Metaboliten wesentlich erleichtern dürfte.

ZUSAMMENFASSUNG

In Hinblick auf die zunehmende Bedeutung der Bestimmung von Plasmaspiegeln antidepressiv wirksamer Substanzen wurde ein Verfahren ausgearbeitet, das auf einfache und genügend empfindliche Weise die Konzentrationsbestimmung dieser Pharmaka im Serum mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie erlaubt.
Qualitativ sind dabei nebeneinander folgende Pharmaka nachweisbar: Haloperidol, Clozapin, Amitriptylin, Imipramin, Sulpirid, Nortriptylin, Desimipramin und Protriptylin.
Die Möglichkeit der quantitativen Bestimmung wurde an Amitriptylin und Nortriptylin unter Verwendung von Protriptylin als internem Standard mit gutem Erfolg überprüft. Die notwendige Serummenge ist 4 ml. Die gemessenen Plasmakonzentrationen lagen bei nur mit Amitriptylin behandelten Patienten für Amitriptylin zwischen 25 und 160 ng/ml Plasma und für Nortriptylin zwischen 25 und 200 ng/ml Plasma. Nortriptylin war durch Demethylierung als Metabolit des Amitriptylins entstanden.
Einer der Vorteile der Hochdruckflüssigkeitschromatographie ist die Tatsache, daß die Pharmaka unzersetzt im Ablauf des Gerätes erscheinen. Die einzeln

aufgefangenen Fraktionen können weiteren physikalisch-chemischen Untersuchungsmethoden zugeführt werden. Von besonderer Bedeutung ist die Einfachheit und die Genauigkeit der Methode. Dieser Umstand erlaubt es in Verbindung mit den bereits erhältlichen vollautomatischen Geräten die Analyse großer Versuchsreihen vorzunehmen. Dies ist eine der Voraussetzungen für die Klärung der Frage inwieweit die Plasmakonzentration eines Psychopharmakons relevant für seine Wirkung ist.

LITERATURVERZEICHNIS

1 ÅSBERG,M.B., B.CRONHOLM, F.SJÖQVIST, D.TUCK :
Relationship between plasma level and therapeutic effect of nortriptyline.
Brit.Med.J. 3, 331, (1971)

2 BAILEY,D.N., P.I.JATLOW :
Gas-chromatographic analysis for therapeutic concentrations of amitriptyline and nortriptyline in plasma with use of nitrogen detector.
Clin.Chem. 22/6, 777 - 781, (1976)

3 BIGGS,J.T., W.H.HOLLAND, S.S.CHANG, P.P.HIPPS, W.R.SHERMAN :
Electron beam ionization mass fragmentographic analysis of tricyclic antidepressants in human plasma.
J.Pharm.Sci. 65, 261 - 268, (1976)

4 BORGÅ,O., M.GARLE :
A gas chromatographic method for the quantitative determination of nortriptyline and some of its metabolits in human plasma and urin.
J.Chromatogr. 68, 77 - 88, (1972)

5 BRAITHWAITE,R., R.GOULDING, G.THEANO, J.BAILEY, A.J.COPPEN :
Plasma concentrations of amitriptyline and clinical response.
Lancet I, 1297 - 1300, (1972)

6 BREYER,U., K.VILLUMSEN :
Measurement of plasma levels of tricyclic psychoactive drugs and their metabolits by UV - reflectance photometry of thin layer chromatograms.
Europ.J.Clin.Pharmacol., 9, 457 - 465, (1976)

7 ENGELHART,H. :
Hochdruckflüssigkeitschromatographie
Springer Verlag 1975

8 GLASSMAN,A.H., J.M.PEREL :
The clinical pharmacology of imipramine - Implications for therapeutics.
Arch.gen.Psychiat. 28, 649, (1973)

9 GLASSMAN,A.H., J.M.PEREL, M.SHOTAK, S.J.KANTOR, J.L.FLEISS :
Clinical implications of imipramine plasma level for depressive illness.
Arch.gen.Psychiat. 34, 197, (1977)

10 GRAM,L.F. :
Metabolism of tricyclic antidepressants. A review.
Dan.med.Bull. 21, 218, (1974)

11 HAMMER,W., S.SJÖQVIST :
Plasma levels of monomethylated tricyclic antidepressants during treatment with imipramin - like compounds.
Life Sci. 6, 1895, (1967)

12 KNOX,J.H., J.JURAND :
Separation of tricyclic psychosedative drugs by high-speed ion-pair partition and liquid-solid adsorption chomatography.
J.Chromatogr. 103, 311 - 326 (1975)

13 KRAGH - SÖRENSEN,P., M.ÅSBERG, C.EGGERT - HANSEN :
Plasma nortriptyline levels in endogeneous depression.
Lancet I, 113, (1973)

14 PEREL,J.M., F.JRANI, M.HURWIC, A.H.GLASSMAN, A.A.MANIAN :
Tricyclic antidepressants: relationship among pharmacokinetics, metabolism and clinical outcome.

Symposium Medica Hoechst 13: Depressive Disorders, 325 - 346, Schattauer Verlag 1978

15 WATSON,J.D., M.J.STEWART :
Separation and quantitative determination of tricyclic antidepressants by high-performance liquid chromatography.
Chromatography 110, 389 - 392 (1975)

16 WATSON,J.D., M.J.STEWART :
Quantitative determination of amitriptyline and nortriptyline in plasma by high-performance liquid chromatography.
Chromatography 132, 155 - 159 (1977)

17 WATSON,J.D., M.J.STEWART :
Assay of tricyclic struktured drugs and their metabolits in urin by high-performance liquid chromatography.
Chromatography 134, 182 - 186 (1977)

18 WHYTE,J.F., A.J.MAC DONALD, G.J.NAYLOR, J.P.MOODY :
Plasma concentrations of protriptyline and clinical effects in depressive woman.
Brit.J.Psychiat. 128, 384 (1976)

19 ZIEGLER,V.E., B.T.CO, P.J.TAYLOR, P.J.CLAYTON, J.T.BIGGS :
Amitriptyline plasma levels and therapeutic response.
Clin.Pharmacol.Ther. 19, 795 (1976)

20 ZIEGLER,V.E., P.J.CLAYTON, J.R.TAYLOR, B.T.CO, J.T.BIGGS :
Nortriptyline plasma levels and therapeutic response.
Clin.Pharmakol.Ther. 20, 458 (1976)

Lebenslauf

10.01.46	in München geboren
	Eltern: Mag.jur.Dipl.Kfm.Eduard Hess
	Johanna Hess, geb. Marks
1952 - 1956	Volksschule in München
1956 - 1966	Wittelsbacher Gymnasium in München
	Abschluß mit Abitur
1966	Studienbeginn für das Fach Chemie an
	der Universität München
1968	Vordiplom für Chemie
1971	Doppelstudium: Humanmedizin - Chemie
1972	Diplomprüfung für Chemie
1973 - 1974	Diplomarbeit bei Prof. Dr.H.G.Zachau
	am Institut für Physiologie und Physio-
	logische Chemie der Universität München
1974	Ärztliche Vorprüfung
13.12.1977	Ärztliche Prüfung an der Universität
	München
seit Jan.1978	Medizinalassistent